

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

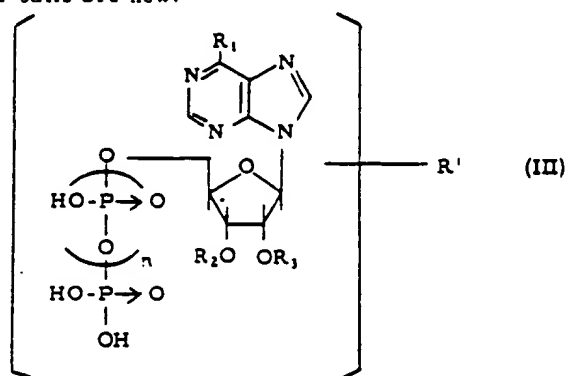
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

16563 E/09 802 CHUS 26.06.80
 CHUGAI PHARMACEUTICAL KK *J5 7011-999
 26.06.80-JP-085923 (21.01.82) C07h-19/20 G01n-33/60
 Iodine labelled adenosine phosphate cpds. - useful for
 radioimmunoassay of AMP, ADP, ATP etc. in ulcer diagnosis, energy
 metabolism determination etc.

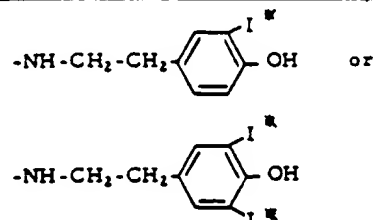
B(4-B3, 5-A4) 2

118

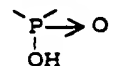
Iodine-contg. adenosine phosphate cpds. of formula (III) and
 their salts are new:



(R' is



bonded to 2-, 6- or 8-position of the purine ring (* shows
 that iodine may be labelled with radioactive isotope);
 R₁ is amino when R' bonds to the 2- or 8-position of the
 purine ring, or R₁ is the same as R' when R' bonds to the
 6-position of the purine ring;
 R₂ and R₃ are both H or phosphoric acid gp. or in combina-
 tion form



n is 0-2).

USES

J57011999+

1-11-1998

Adenosine phosphate cpds. are distributed widely in the form of adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate (ADP) or adenosine triphosphate (ATP) in the living body, and are involved in energy metabolism. Determination of concn. in body fluids is often required. Recently diagnosis of ulcer may be carried out by means of ATP, coenzyme A or their derivs. (B-protein assay). (I) are useful as starting materials for radioactive iodine-labelled cpds. for radioimmunoassay of AMP, ADP, ATP etc. and is intermediates for the synthesis of radioactive iodine-labelled coenzyme A cpds. (see J57011996).

PREPARATION

(III) can be prepd. by reacting the corresp. iodine-free cpds. (II) (described in J57011998) or their salts with (1) iodine/alkali iodide aq. soln., opt. in the presence of alkali iodide labelled with radioactive iodine, or (2) alkali iodide (opt. labelled with radioactive iodine) in the presence of oxidising agent.

EXAMPLE

Mixt. of 8-bromoadenosine-5'-phosphate ammonium salt (0.6g), 4-hydroxyphenethylamine (1.4g) and water (30 ml) was heated and refluxed with stirring at 140-150°C for 2 hrs. After cooling, insoluble substance was filtered off and the filtrate was adsorbed on DEAE-cellulose

(HCO₃⁻ form, 2 x 50 cm) and eluted with a concn. gradient of 0.01 M NH₄HCO₃ - 0.25 M NH₄HCO₃. Fractions containing end prod. were evapd. Residue was dissolved in water (5 ml). NEt₃ (1 ml) was added. Solvent was evapd. and a small amt. of ethanol was added. Ethanol was evapd. to give colourless powder of 6-(4-hydroxyphenethylamino)-adenosine-5'-phosphate (triethylammonium salt) (IIa) (0.4g).

(IIa) (100 mg) was dissolved in 0.25M aq. KHCO₃ (11 ml). Iodine-potassium iodide aq. soln. (KI 100 mg, I₂ 127 mg dissolved in 10% ethanol aq. soln. 10 ml) (3.5 ml) was added dropwise with ice-cooling and stirring. The mixt. was stirred further for 10 minutes. Water (20 ml) was added and the resultant mixt. was adsorbed on DEAE cellulose (HCO₃⁻ form, 1.2 x 15 cm). Adsorbed substance was eluted with a concn. gradient of 0.01-0.5 M NH₄HCO₃. Fractions containing 8-(3-iodo-4-hydroxy-phenethylamino) adenosine-5'-phosphate (monoiodide) and 8-(3,5-diiodo-4-hydroxyphenethylamino)adenosine-5'-phosphate (diiodide) were obtained. The fractions were evapd. and water was added into residue. Operation for distilling off NH₄HCO₃ was repeated. Ethanol was added and ethanol was distilled off. Pale yellow powders of monoiodide (ammonium salt) (30 mg) and diiodide (ammonium salt) (25 mg) were obtained. (8ppW69).

J57011999

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-11999

⑤ Int. Cl.³

C 07 H 19/20

G 01 N 33/60

識別記号

庁内整理番号

7252-4C

6422-2G

④ 公開 昭和57年(1982)1月21日

発明の数 2

審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑭ ヨードの導入された新規アデノシン磷酸化合物及びその製法

① 特 願 昭55-85923

② 出 願 昭55(1980)6月26日

⑦ 発 明 者 田中貞夫

東京都豊島区高田3丁目41番8
号中外製薬株式会社総合研究所
内

⑧ 発 明 者 松永功

東京都豊島区高田3丁目41番8
号中外製薬株式会社総合研究所

⑦ 発 明 者 蒲池信一

東京都豊島区高田3丁目41番8
号中外製薬株式会社総合研究所
内

⑧ 発 明 者 若林清重

東京都豊島区高田3丁目41番8
号中外製薬株式会社総合研究所
内

⑨ 出 願 人 中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

⑩ 代 理 人 安藤憲章

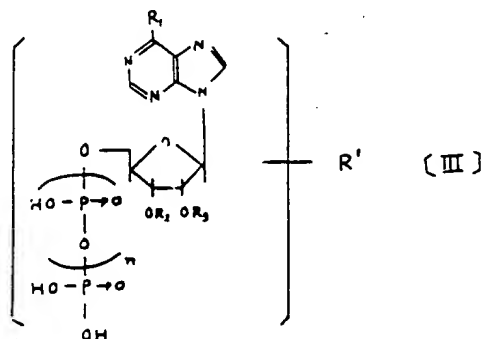
明 細 書

1. 発明の名称

ヨードの導入された新規アデノシン磷酸化合物及びその製法

2. 特許請求の範囲

1) 一般式、

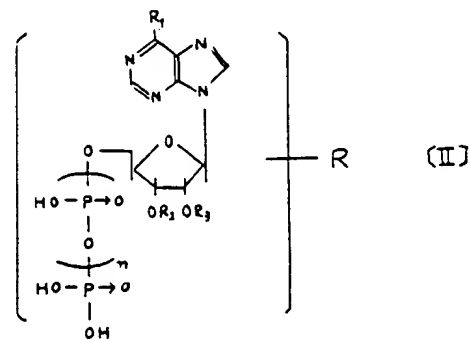


(式中、R'はプリン環の2位、6位若しくは8位に結合する $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{I}^+$ または $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{I}^+$ を示し(=で、I⁺の*印はヨードが放射性同位元素で標識されていることを示す)、R₁はR'がプリン環の2位若しくは8位に結合するときにはアミノ基を、6位に結合するときには何を示さず、R₂はR'がプリン環の2位、6位若しくは8位に結合するときには何を示さず、R₂及びR₃は水素若しくは磷酸基を、又は共同して $-\text{P}(\text{OH})_2$ を示し、nは0~2

(1)

するときは何も示さず、R'と同じものにより、R₂及びR₃は共に水素若しくは磷酸基を、又は共同して $-\text{P}(\text{OH})_2$ を示し、nは0~2の整数を示す]で表わされるヨードの導入されたアデノシン磷酸化合物又はその塩。

2) 一般式、



(式中、Rはプリン環の2位、6位若しくは8位に結合する $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ を示し、R₁はRがプリン環の2位若しくは8位に結合するときにはアミノ基を、6位に結合するときには何も示さず、R₂はR'がプリン環の2位、6位若しくは8位に結合するときには何を示さず、R₂及びR₃は水素若しくは磷酸基を、又は共同して $-\text{P}(\text{OH})_2$ を示し、nは0~2

(2)

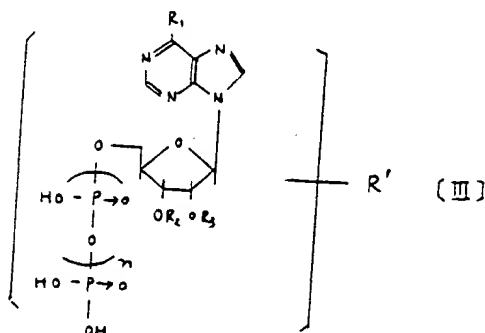
の整数を n で表わす)のアデノシン磷酸化合物若しくはその塩。

① 放射性ヨードで標識されたヨード化アルカリの存在若しくは不存在下ヨード-ヨード化アルカリ水溶液を作用させる。

② または、

③ 酸化剤の存在下放射性ヨードで標識された若しくはされていなしヨード化アルカリを作用させる

ことを特徴とする一般式。



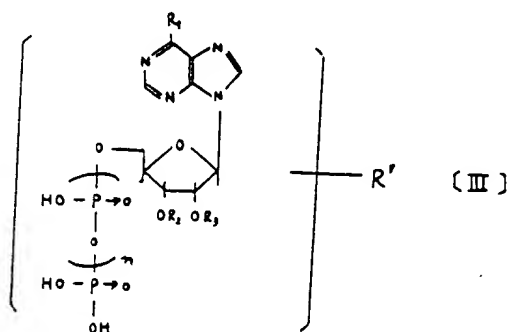
(式中、 R' はプリン環の2位、6位若しくは8位に結合する $-NH-CH_2-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ または

(3)

用化が期待されてゐる(特開昭53-41421号、特開昭54-17871号、特開昭54-160813号等)。

本発明は、AMP、ADP、ATP等ラジオリソーム/アッセイを行う際の放射性ヨード標識化合物として有用であり、また、上記B-プロテインアッセイに効果的に用いることのできる放射性ヨード標識化合物若しくはその為の合成中間体として有用な物質及びその製造法を提供することを目的とする。

本発明によれば、本発明の目的化合物は一般式、



(式中、 R' はプリン環の2位、6位若しくは8位に結合する $-NH-CH_2-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ または、

(5)

特開昭57-11999(2)

$-NH-CH_2-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ を示し(==で、 I^* の*印はヨードが放射性同位元素で標識されてゐてもよいことを示す)、 R' は R' がプリン環の2位若しくは8位に結合するときにはアミノ基を、6位に結合するときには何も示さず R' と同じものになり、 R_2 、 R_3 及び n は前記と同一のものを示す]で表わされる化合物の製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、ヨードの導入された新規アデノシン磷酸化合物若しくはその塩及びその製法に関する。

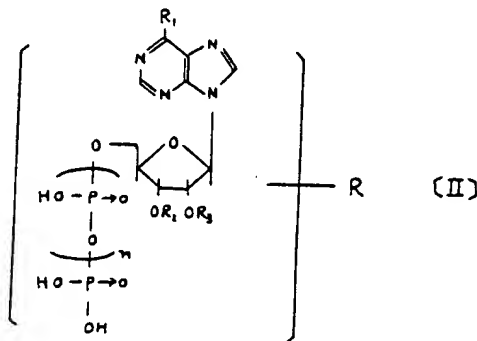
アデノシン磷酸化合物は、アデノシンモノフォスフェート(AMP)、アデノシンジフォスフェート(ADP)あるいはアデノシントリフォスフェート(ATP)の形で広く生体内に含有する物質であつて、生体のエネルギー代謝に関与すること知られ、生体中の濃度を測定する必要性がある場合がある。

また、近年では、ATP、コエンザイムAまたはこれらの誘導体を用いて癌の診断を行う方法(B-プロテインアッセイ)が見出され、その実

(4)

$-NH-CH_2-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ を示し(==で、 I^* の*印はヨードが放射性同位元素で標識されてゐてもよいことを示す)、 R' は R' がプリン環の2位若しくは8位に結合するときにはアミノ基を、6位に結合するときには何も示さず R' と同じものになり、 R_2 及び R_3 は水素若しくは磷酸基を、又は共同して $-P(=O)(OH)_2$ を示し、 n は0~2の整数を n で表わされる。

本発明の化合物は、一般式、



(式中、 R はプリン環の2位、6位若しくは8位に結合する $-NH-CH_2-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ を示し、 R' は R がプリン環の2位若しくは8位に結合するときにはア

(6)

ミノ基を、6位に結合するときは何も示さずRと
同じものとする。R₂、R₃及びnは前記と同一の
ものを示す)で表わされるアデノシン磷酸化合物
若しくはその塩(化合物II)を、

- ① 放射性ヨードで標識されたヨード-ヨ-化アルカ
リの存在若しくは不存在下にヨード-ヨ
-化アルカリ水溶液を作用させる、

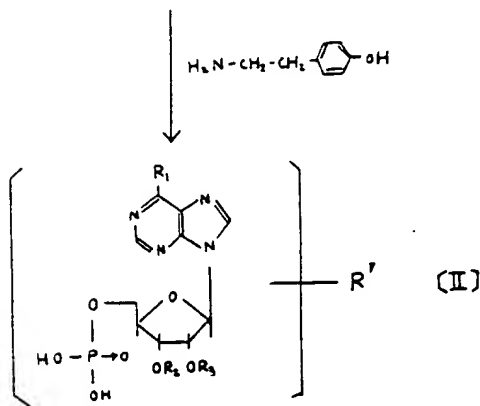
が、又は、

- ② 酸化剤の存在下放射性ヨードで標識され
た若しくはされていないヨード-ヨ-化アルカリ
を作用させる

により得ることを出来る。

目的化合物のうち、放射性ヨードで標識されて
いない化合物は放射性ヨードで標識された化合物
のキャリアーとしての有用性があり、このものを
得るためには上記反応において放射性ヨードで標識
したヨード-ヨ-化アルカリを一切用いないで反応を行え
ば得ることが出来る。また、逆に放射性ヨードで
標識した目的物を得るためには、放射性ヨードで
標識したヨード-ヨ-化アルカリの存在下にヨード-ヨ-化

(7)



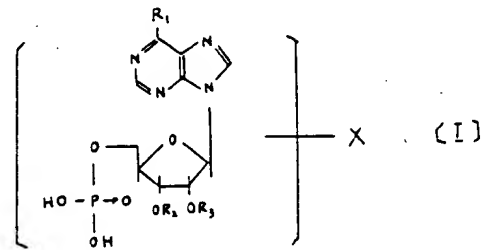
(上記反応式中、Xはプリン環の2位、6位若
しくは8位に結合するハロゲン原子を示し、R₁はX
又はR'がプリン環の2位若しくは8位に結合する
ときにはアミノ基を、6位に結合するときは何も
示さず、R₂、R₃及びnは前記と同一のものを示す
]の如き反応で得られ、また、化合物II (n=1
又は2)は化合物II (n=0)に磷酸若しくはヒロ
磷酸を反応させることにより得ることが出来る。
化合物IIは逆離型のままで用いてもよいが、トリ
メチルアンモニウム塩、トリエチルアンモニウム

(9)

アルカリ水溶液を化合物IIに作用させるか、又は
放射性ヨードで標識したヨード-ヨ-化アルカリを化合物
IIに作用させる。

化合物IIにヨード-ヨ-化アルカリを作用させる
上記①の反応は、化合物IIを少量の弱塩基性水溶
液、たとえば重碳酸カリウム水溶液に溶解した後、
0~30℃にて攪拌下ヨード-ヨ-化アルカリ水溶
液を徐々に加えて行く。反応は、添加とともに
ほとんど瞬時に進行するが、更に好ましき結果を
得るためには添加終了後10~20分間攪拌を継続
した方がよい。

反応原料としての化合物IIは新規化合物であり、
化合物II (n=0)は、



(8)

塩等の塩基性塩の形で用いることが好ましい。も
う一方の反応原料であるヨード-ヨ-化アルカリ水
溶液としては、ヨード化ナトリウム、ヨード化カリウ
ム、ヨード化リチウム等をヨードと共に少量のエタ
ノールを含有する水に溶解したものである。

上記①の反応で放射性ヨードで標識した化合物
を得るためには、化合物IIにヨード-ヨ-化アルカ
リ水溶液を作用させる際に放射性ヨードで標識し
たヨード-ヨ-化アルカリを共存させて同反応を実施すべ
い。放射性ヨードで標識したヨード-ヨ-化アルカリ
としては、³H、¹²⁵I、¹³¹I等で標識したヨード化ナトリ
ウム、ヨード化カリウム、ヨード化リチウム等が用い
られ、その使用量は極く少量である。より多くの
標識ヨード-ヨ-化アルカリを用いればそれだけ比放射能
の高い目的物が得られる。

本発明の目的化合物は、化合物IIに酸化剤の存
在下放射性ヨードで標識された若しくはされていないヨード-ヨ-化アルカリを作用させても得られる(上
記②の方法)。この方法において用いられる原料
化合物II、放射性ヨードで標識したヨード-ヨ-化アルカ

リ等は上記①の方法で用いたものと全く同じのものでよい。この④の方法は特に目的物として放射性ヨードで標識したものを得るのに適した方法であり、反応は次の如くして行う。

すなわち、最初に化合物Ⅱを放射性ヨードで標識し、ヨード化アルカリとともに pH 7.0 附近に調整した緩衝液に溶解し、次いで酸化剤を加え、反応させる。緩衝液としては酢酸緩衝液が、酸化剤としてはフロウレンツが好ましい。反応はフロウレンツの添加とともに瞬時に進行するので、反応開始後遅くとも 2 分後には反応を停止させることが肝要である。

上記①及び④の方法において、反応温度から目的物を分離するためには、DEAE-セルロース、QAE-セルロース、ECTEOA-セルロース、DEAE-セファデックス等の弱塩基性のイオン交換セルロース若しくはイオン交換セファデックスを用いたカラムクロマトグラフィーにより行う。溶出は、濃度勾配法により、溶出溶媒としてはアンモニウムアセテート、炭酸アンモニウム、重炭酸アンモ

(11)

実施例 1

a) 8-(4-ヒドロキシフェニルアミノ)アダノシン-5'-フォスフェート

8-ブROMOアダノシン-5'-フォスフェートのアンモニウム塩 0.6g、4-ヒドロキシフェニルアミン 1.4g、水 30 ml の混合物を攪拌下 140~150°C にて 2 時間加熱還流する。冷却後、不溶物を濾過し濾液を DEAE-セルロース (HCO_3^- 型, $2 \times 50 \text{ cm}$) に吸着、0.01 M NH_4HCO_3 ~ 0.25 M NH_4HCO_3 の濃度勾配法にて溶出する。目的物の検量は紫外線吸収スペクトルと高速液体クロマトグラフィーで行ない、目的物を含有する画分について減圧下 30~35°C にて溶媒を留去する。水 5 ml で残留物を溶解し、トリエチルアミン 1 ml を加えて減圧下溶媒を留去する。然る後、少量のエタノールを加えてエタノールを留去すれば、無色粉末状の 8-(4-ヒドロキシフェニルアミノ)アダノシン-5'-フォスフェート (トリエチルアンモニウム塩) 0.4g を得る。

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$: 278 nm

元素分析値 : $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{N}_4\text{P} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ とて

(12)

特開昭57-11999 (4)

ニウム等を用いる。カラムクロマトグラフィーにおける目的物質の検量は、紫外線吸収スペクトルと高速液体クロマトグラフィーにより行ない、目的物質は、目的物質を含む画分を減圧下、溶媒を留去することにより、通常塩化物で得る。

本発明の目的化合物のうち、放射性ヨードで標識されてゐるものは、AMP、ADP あるいは ATP のラジオイムノアッセイの試薬として有用であり、化合物Ⅲ ($m=2$) の放射性ヨード標識化合物は特開昭53-41421号のB-プロテインアッセイの試薬として有用である。更に、化合物Ⅲ ($m=0$) の放射性ヨード標識化合物は4'-フォスホペンチンと反応させてコンザイムA化合物類にするにより特開昭54-17871号及び特開昭54-160813号のB-プロテインアッセイ用の試薬とすることが出来る。また更に、本発明の化合物で放射性ヨードを含まないものは上記放射性標識化合物のキャリアーとして用いられるほか、それ自体が低毒性で強いX線造影剤としても用いられる。以下に本発明の実施例を示す。

(13)

	C	H	N
理論値(%)	48.64	6.63	16.55
実測値(%)	48.79	6.81	16.34

b) a) で得られた 8-(4-ヒドロキシフェニルアミノ)アダノシン-5'-フォスフェート (トリエチルアンモニウム塩) 100 mg を 0.25 M 重炭酸カリウム溶液 1 ml に溶解し、ヨード-ヨード化カリウム水溶液 (KI 100 mg, I_2 127 mg を 10% エタノール水溶液 10 ml に溶解したもの) 3.5 ml を氷冷攪拌下に滴下する。滴下終了後、さらに 10 分間攪拌し、反応溶液に水 20 ml を加えて DEAE-セルロース (HCO_3^- 型, $1.2 \times 15 \text{ cm}$) に吸着させる。0.01 ~ 0.5 M NH_4HCO_3 の濃度勾配法で溶出、紫外線吸収スペクトル及び高速液体クロマトグラフィー (カラム: リフゾール RP-18, 溶出液: 1% テトラメチルアンモニウムフォスフェート (PH 2.9); $\text{CN}(8:2)$ ~~アセトン~~) で検量しながら、8-(3'-ヨード-4-ヒドロキシフェニルアミノ)アダノシン-5'-フォスフェート (モノヨード体) を含有

(14)

すり画分と、8-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェート(ジヨード体)を含有すり画分を得た。

夫々の画分を減圧下30~35℃で溶媒を留去、残留物に水を加えて NH_4HCO_3 を留去すの操作を繰り返し、エタノールを加えて~~エタノール~~を留去すれば、淡黄色粉末状モノヨード体(アンモニウム塩)30mg及びジヨード体(アンモニウム塩)25mgを得た。

モノヨード体; $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$: 278 nm

元素分析値: $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}_8\text{PI}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ として

	C	H	N
理論値(%)	33.60	4.23	15.24
実測値(%)	33.72	4.15	15.13

ジヨード体; $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$: 280 nm

元素分析値: $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}_8\text{PI}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

	C	H	N
理論値(%)	27.46	3.58	12.45
実測値(%)	27.62	3.50	12.37

(15)

せ、DEAE-セルロース(HCO_3^- 型、 $1 \times 10 \text{ cm}$)に吸着せしめ、次いで0.01~0.5M NH_4HCO_3 の濃度可配法で溶出し、ガンマ-カウンターで検索して目的とする画分を集める。この画分について、減圧下溶媒を留去、濃縮し、 $[\text{I}^{125}]$ -8-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェート(アンモニウム塩)(160 μCi)を得た。

本物質はセルロース薄層クロマトグラフィー(検出: ラジオフロマトスキャナー及び紫外線ランプ)で実施例(1b)で得られたモノヨード体と同一の R_f 値を有することが確認され、更に同モノヨード体と混じった状態でDEAE-セルロース(HCO_3^- 型)を用いたカラムクロマトグラフィーを行ない、モノヨード体のフラクションに放射能を認めた。

実施例4

実施例(1a)で得られた8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェート(トリエチルアンモニウム塩)150mg、重炭酸カリウム溶液300mgと水30mlに溶解し、室温で

(17)

マススベクトル(FDマススベクトル): ベアレン
トピーク = 734 m/e

実施例2

実施例(1b)において、8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェート(トリエチルアンモニウム塩)とヨードヨ-化カリウム水溶液と反応せしめるときに、 Na^{125}I (100 μCi)を存在せしめて同様の実験を行ない、 $[\text{I}^{125}]$ -8-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェート(アンモニウム塩)30mg (10 μCi)及び $[\text{I}^{125}]$ -8-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェート(アンモニウム塩)25mg (20 μCi)を得た。

実施例3

実施例(1a)で得られた8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェートのアンモニウム塩30 μg 、 Na^{125}I 200 μCi を0.5M 磷酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し、フロラミンT 100 μg を減圧下に加え、60秒後ソジウムメタビサルファイト 200 μg を加えて反応を停止す

(16)

撈拌下0.02Mヨード-ヨ-化カリウム水溶液と反応混液が着色するまで滴下す(約20 ml)。

滴下終了後さらに10分間撈拌し、反応混液に0.01M NaHSO_3 水溶液を加えて過剰の I_2 を分解す。反応混液を0.5N HCl 水溶液でpH 2.7とし、活性炭1gを加えて15分間撈拌す。活性炭を濾取し、水100mlで洗滌した後濃 NH_4OH :エタノール: H_2O (1:25:25)で溶出し、紫外線吸収スペクトルを用いて目的物を含有すり画分を集める。この画分について減圧下溶媒を留去すると、淡黄色粉末を得るので、本粉末を水に溶解(DEAEセルロース(HCO_3^- 型、 $1.5 \times 30 \text{ cm}$))に吸着せしめ、次いで0.01~0.5M NH_4HCO_3 の濃度可配法で溶出し紫外線吸収スペクトルと高速液体クロマトグラフィーで検索しながら目的物質を含有すり画分を集める。この画分について減圧下溶媒を留去、数回水を加えて NH_4HCO_3 を留去すると淡黄色粉末として8-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェートのアンモニウム塩150mgを得た。

(18)

本物質は高純度プロマトグラフィ-〔カラム：リクロゾルアR₁₈〕、溶出溶液；0.1% テトラメチルアンモニウムフォスフェート（PH 2.9）：CH₃CN（8：2）〕で実施例1 b) で得られた 8-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-5'-フォスフェートのアンモニウム塩と同一のリテンションタイムを有することが確認された。

実施例5

実施例4において、8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-5'-フォスフェートのトリエチルアン



(19)

b) 8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-2',3'-サイクリック-5'-ジフォスフェート（ヒストリエチルアンモニウム塩）30μg, Na¹²⁵I 200μCi を用いて実施例3と同様に処理して〔¹²⁵I〕-8-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-2',3'-サイクリック-5'-ジフォスフェート（ヒストリエチルアンモニウム塩）（150μCi）を得た。

実施例7

実施例6 a) と同様に処理して得た 8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-2',3'-サイクリック-5'-ジフォスフェート（ヒストリエチルアンモニウム塩）50mg とヨード-ヨ-ヒカリウム溶液（KI 100mg, I₂ 127mg を10%エタノール水溶液に溶解したもの）1.7ml を用いて実施例1 b) と同様の処理をして、淡黄色粉末状の 8-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-2',3'-サイクリック-5'-ジフォスフェート（ヒストリエチルアンモニウム塩）〔モノヨード体〕15mg 及び淡黄色粉末状の 8-(3,5-ジヨード-



モノヨード体 150mg とヨード-ヨ-ヒカリウム水溶液1ml を作用させた際に、Na¹²⁵I 100μCi を用いて同実験を行ない、淡黄色粉末状の〔¹²⁵I〕-8-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-5'-フォスフェートのアンモニウム塩（6μCi）150mg を得た。UV λ_{max}^{H₂O} : 280nm。
実施例6

a) 8-プロモアデノシン-2',3'-サイクリック-5'-ジフォスフェート100mg, p-ヒドロキシフェネチルアミン 300mg, 水 10ml の混合物を実施例1 a) と同様に処理して無色粉末状の 8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-2',3'-サイクリック-5'-ジフォスフェート（ヒストリエチルアンモニウム塩）100mg を得た。

紫外部吸収：UV λ_{max}^{H₂O} = 277nm

元素分析値：C₃₀H₃₂N₈O₁₀P₂・2H₂O として

	C	H	N
理論値(%)	46.05	7.21	14.32
実測値(%)	46.12	7.20	14.29



4-ヒドロキシフェネチルアミノ) アデノシン-2',3'-サイクリック-5'-ジフォスフェート（ヒストリエチルアンモニウム塩）〔ジヨード体〕15mg を得た。

モノヨード体

紫外部吸収：UV λ_{max}^{H₂O} = 278nm

元素分析値：C₃₀H₃₁N₈O₁₀P₂I・2H₂O として

	C	H	N
理論値(%)	39.65	6.10	12.33
実測値(%)	39.52	6.21	12.28

ジヨード体

紫外部吸収：UV λ_{max}^{H₂O} = 280nm

元素分析値：C₃₀H₃₀N₈O₁₀P₂I₂・2H₂O として

	C	H	N
理論値(%)	34.83	5.26	10.83
実測値(%)	34.62	5.53	10.75

実施例8

a) 6-クロロプリンリボシド-5'-モノフォスフェート（ナトリウム塩）36.7mg を水 5ml に溶解し、4-ヒドロキシフェネチルアミン 274mg を



1 N HCl で PH 7.0 にして溶解した溶液 (5 ml) を加え、80 °C で6時間加熱、攪拌す。反応混合液を高速度液体クロマトグラフィー (カラム; リクロソル GRP-18, 溶出液; 1% テトラメチルアンモニウムフォスフェート (PH 2.9); CH₃CN = 9:1) で確認す。

次に、反応混合物を DEAE-セルロース (HCO₃⁻ 型, 1.5 × 20 cm) に吸着、0.01 M NH₄HCO₃ ~ 0.2 M NH₄HCO₃ の濃度勾配法にて溶出す。

紫外吸収スペクトル及び高速度液体クロマトグラフィーで検索しながら、目的画分を使い、減圧下 35 °C で濃縮して無色粉末状の N⁶-(4-ヒドロキシフェニル) アデノシン-5'-モノフォスフェート (アンモニウム塩) 12 mg を得た。

UV_{max}^{H₂O}: 268 nm

元素分析値: C₁₈H₂₇N₆O₈ · P · 2H₂O として

	C	H	N
理論値 (%)	41.54	5.62	16.15
実測値 (%)	41.68	5.75	16.04



粉末状の N⁶-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェニル) アデノシン-5'-モノフォスフェート (アンモニウム塩) [モノヨード体] 3 mg 及び淡黄色粉末状の N⁶-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェニル) アデノシン-5'-モノフォスフェート (アンモニウム塩) [ジヨード体] 3 mg を得た。

モノヨード体

紫外吸収; UV_{max}^{H₂O} = 271 nm

元素分析値: C₁₈H₂₅N₆O₈ · PI · 2H₂O として

	C	H	N
理論値 (%)	33.45	4.37	13.00
実測値 (%)	33.52	4.45	12.92

ジヨード体

紫外吸収; UV_{max}^{H₂O} = 268 nm

元素分析値: C₁₈H₂₃N₆O₈ · PI₂ · 2H₂O として

	C	H	N
理論値 (%)	28.00	3.52	10.88
実測値 (%)	28.12	3.58	10.77



b) a) で得た N⁶-(4-ヒドロキシフェニル) アデノシン-5'-モノフォスフェート 10 mg を 5 ml に溶解し、重炭酸カリウム水溶液 (50 mg/ml) を 1 ml 加え、氷冷下攪拌しながらヨード-ヨード化カリウム水溶液 (10% エタノール水溶液 10 ml に I₂ 127 mg と KI 100 mg を溶解したもの) 0.4 ml を滴下す。反応混合液について高速度液体クロマトグラフィー (カラム; リクロソル GRP-18, 溶出液; 0.1% トリメチルアンモニウムフォスフェート (PH 2.9); CH₃CN (8:2) PH 2.9) で目的物の生成を確認した後、DEAE-セルロースを用いたカラムクロマトグラフィー (HCO₃⁻ 型, 1.7 × 10 cm) に吸着させ、次いで 0.01 ~ 0.5 M NH₄HCO₃ の濃度勾配法にて目的物を溶出す。紫外吸収スペクトルで検索しながら、目的画分として N⁶-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェニル) アデノシン-5'-モノフォスフェートの画分及び N⁶-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェニル) アデノシン-5'-モノフォスフェートの画分を得、これらと夫々減圧下 35 °C にて濃縮して、淡黄色



実施例 9

実施例 8 a) で得られた N⁶-(4-ヒドロキシフェニル) アデノシン-5'-モノフォスフェート 30 µg を 0.5 M 磷酸緩衝液 (PH 7.0) 50 µl に溶解し、NaI 0.6 µg 及び Na¹²⁵I 100 µCi を添加し、フロラミン T 100 µg を加え、1 分間反応後 Na₂S₂O₅ 200 µg を加え、反応混合液についてヨード標識化合物の生成とセルロース薄層クロマトグラフィー (展開溶媒; エタノール: 0.5 M 酢酸アンモニウム = 5:2) で確認した後、DEAE-セルロースを用いたカラムクロマトグラフィー (HCO₃⁻ 型, 1.7 × 10 cm) に吸着させ、次いで 0.01 ~ 0.5 M NH₄HCO₃ の濃度勾配法にて目的物を溶出す。この画分について、減圧下濃縮して、淡黄色粉末状の [125I]-N⁶-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェニル) アデノシン-5'-モノフォスフェート (アンモニウム塩) (70% 収率) を得た。

~~実施例 10~~

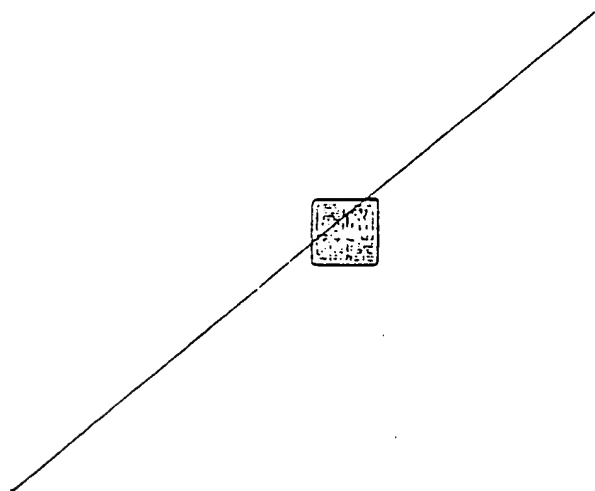
~~a) 4-ヒドロキシフェニルアデノシン-5'-モノフォスフェート (アンモニウム塩) 50 mg を~~



スフェート(アンモニウム塩)(モノヨード体)($30\mu\text{Ci}$)及び $[^{125}\text{I}]-\text{N}^6-(3,5\text{-ジヨード}-4\text{-ヒドロキシフェネチル})\text{アデノシン}-5'\text{-モノフォスフェート(アンモニウム塩)}(\text{ジヨード体})(40\mu\text{Ci})$ を得た。

実施例 10

a) 8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェート(アンモニウム塩) 30mg と



(29)

塩を留去する。残留物に水 50ml を加え、反応混液を D E A E セルロース (HCO_3^- 型, $2 \times 30\text{cm}$) に吸着し、 $0 \sim 0.5\text{M}$ NH_4HCO_3 の濃度勾配法で溶出。管外部吸収スベクトル及び高速液体クロマトグラフィーを用いて目的物を含有する画分を集め、減圧下 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で溶媒を留去して無色粉末の 8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-トリフォスフェート(アンモニウム塩) 5.8mg を得た。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$: 278nm

b) 上記 a) で得た 8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-トリフォスフェート(アンモニウム塩) 5.8mg と水 5ml に溶解し、トリエチルアミン 1ml を加えて減圧下、溶媒を留去すると 8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-トリフォスフェートのトリエチルアンモニウム塩を得る。

8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)-アデノシン-5'-トリフォスフェートのトリエチルアンモニウム塩 5mg を実施例 1 b) と同様に操作すれば、淡黄色粉末状の 8-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェ

特開昭57-11999 (8)

ネチルアミン 9mg とニコチン 1ml に溶解したものを加え溶媒を留去する。この残留物について無水ニコチン 5ml を加え、ニコチンを留去する操作を3回繰り返せば、8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェートトリブチルアンモニウム塩が得られる。

8-(4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-フォスフェートのトリブチルアンモニウム塩 26mg と無水ジメチルフォルムアミド 1ml に溶解し、1,1'-カルボニルジイミダゾール 32.5mg と無水ジメチルフォルムアミド 1ml に溶解したものを加えて防湿下、室温にて4時間放置、反応させる。次いでメタノール 2ml を加え30分間放置して過剰の1,1'-カルボニルジイミダゾールを分解する。然る後ニコリン酸のトリブチルアンモニウム塩 109mg と無水ジメチルフォルムアミド 1ml に溶解したものを加え、防湿下室温にて20時間放置反応させる。

次いで、メタノール 0.1ml を加え、30分間放置して反応を停止させ、減圧下 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ にて溶



ネチルアミノ)アデノシン-5'-トリフォスフェート(アンモニウム塩)(モノヨード体) 2mg 及び淡黄色粉末状の 8-(3-ヨード-4-ヒドロキシフェネチルアミノ)アデノシン-5'-トリフォスフェート(アンモニウム塩)(モノヨード体) 2mg を得る。

モノヨード体

管外部吸収: UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = 278\text{nm}$

ジヨード体

管外部吸収: UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = 278\text{nm}$

出願人 中外製薬株式会社
代理人 安藤 憲 幸

